



# アッセイプロトコル

培養上清の腎毒性バイオマーカー測定

創薬研究用ヒト腎細胞

3D-RPTEC<sup>®</sup>

日機装株式会社

## はじめに

このたびは、”3D-RPTEC”をお買い上げいただきありがとうございます。本稿は 3D-RPTEC を用いた腎毒性バイオマーカー測定（培養上清を用いた AlphaLISA）のプロトコル例を示したものになります。3D-RPTEC を用いた評価のご参考になれば幸いです。

## 目次

1. 使用機器・試薬類 .....	- 3 -
2. 実施例 .....	- 4 -
2-1. サンプル回収 .....	- 4 -
2-2. 事前準備（96well プレート 1 枚分を測定する場合） .....	- 4 -
2-3. 実施プロトコル .....	- 4 -
3. 問い合わせ先 .....	- 5 -

## 1. 使用機器・試薬類

以下に腎毒性バイオマーカー測定（培養上清を用いた AlphaLISA）に必要な機器や試薬の一例を示しております。各施設でのご使用に合わせて適宜改変してください。

### 測定機器

- ・マイクロプレートリーダー（Nivo Alpha S、Revvity 社）

### 測定用機材

製品名	製造	カタログ番号	規格/容量
AlphaPlate 96-well 1/2 Area, light gray	Revvity	6002350	1 箱 50 枚入り

以下に Revvity 社が販売する KIM-1 および NGAL（腎毒性のバイオマーカー）の AlphaLISA キットを記します。AlphaLISA（Alpha アッセイ）は従来の ELISA アッセイよりも高感度な測定系であるため、3D-RPTEC のスフェロイド 1 個から検出可能です。以下の試薬を用いた実施例を「2. 実施例」に示します。

### 試薬類

製品名	製造元	製品番号	規格	測定対象
AlphaLISA® KIM-1 (Human) Detection Kit*1	Revvity	AL3075 HV	100 Assay points	Kidney Injury Molecule-1
AlphaLISA® Human NGAL Detection Kit *2	Revvity	AL364 HV	100 Assay points	Neutrophil Gelatinase- Associated Lipocalin

1：腎障害分子 1（Kidney Injury Molecule-1：KIM-1）は、ムチン様ドメインおよび免疫グロブリンドメインを有する I 型膜貫通タンパク質。KIM-1 は広範に発現しており、特に腎臓および精巣において高発現が認められる。KIM-1 は腎障害、特に近位尿細管障害のバイオマーカーとして機能し、腎細胞癌や急性尿細管壊死などの病態では、KIM-1 濃度が著しく上昇することが報告されている。

2：NGAL（Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin）は、炎症細胞によって産生されるタンパク質。TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインによる免疫細胞刺激などに応答して分泌されることが知られている。NGAL は炎症関連の多くの病態において高値を示し、炎症、肺炎、腎不全、肥満、がん、髄膜炎、膀胱感染症、アルツハイマー病などが含まれる。腎臓においては急性腎障害の炎症マーカーとして、尿細管障害が起きた際に発現が亢進することが報告されている。

## 2. 実施例

### 2-1. サンプル回収

1. 毒性試験等で使用した培養プレートの上清を測定サンプルとしてマイクロピペットを用いて回収する。  
※3D-RPTEC 96well-Single (96well プレート) の 1well の培養上清から測定可能
2. 経時的に回収する場合は培地交換時に古い培養上清としてサンプルを回収する。
3. 回収した培養上清はマイクロチューブ等に移し、-80℃の超低温槽内で保管する。サンプルの分解防止のため長期間の保管は避け、できる限り早く測定することを推奨する。

### 2-2. 事前準備 (96well プレート 1 枚分を測定する場合)

1. キットに含まれる Human KIM-1 (or NGAL) Analyte (標準品) を 100  $\mu$ L の水 (Milli-Q® グレード) に溶解し、10  $\mu$ L ずつ分注して-20℃に保存する。  
※定量が必要な場合はサンプル測定と同時に測定してください。  
※希釈系列はキット取扱説明書の通りに実施してください。
2. 1×AlphaLISA Immunoassay Buffer の調製 (測定直前に実施、100 Assay points 分) :  
キットに含まれる AlphaLISA Immunoassay Buffer (10×) 1 mL を 9 mL の水 (Milli-Q® グレード) に加える。
3. 2.5× AlphaLISA Anti-KIM-1 (or NGAL) Acceptor beads (25  $\mu$ g/mL) + Biotinylated Anti-KIM-1 (or NGAL) Antibody (2.5 nM) の調製 (測定直前に実施、100 Assay points 分) :  
キットに含まれる 5 mg/mL Anti-KIM-1 (or NGAL) Acceptor beads 10  $\mu$ L と 500 nM Biotinylated Anti-KIM-1 (or NGAL) Antibody 10  $\mu$ L を、前述の 2 項で調製した 1×AlphaLISA Immunoassay Buffer 1980  $\mu$ L に加える。(計 2.0 mL)
4. 2× Streptavidin (SA)-coated Donor beads (80  $\mu$ g/mL) の調製 (測定直前に実施、100 Assay points 分) :  
キットに含まれる 5 mg/mL Streptavidin (SA)-coated Donor beads 40  $\mu$ L を、前述の 2 項で調製した 1×AlphaLISA Immunoassay Buffer 2460  $\mu$ L に加える。(計 2.5 mL)

### 2-3. 実施プロトコル

Revvity 社のキット取扱説明書に従って以下の通り操作する。以下はハーフエリアプレートを使用した方法を記載する。

1. 各サンプルから 5  $\mu$ L を白色のハーフエリア 96 ウェルプレートに分注する。

2. 2.5× AlphaLISA Anti-KIM-1 (or NGAL) Acceptor beads (25 µg/mL) + Biotinylated Anti-KIM-1 (or NGAL) Antibody (2.5 nM) の混合液 (2-2.事前準備の 3 項で調製) 20 µL を加える。
3. 室温で 60 分間インキュベートする。
4. 2× Streptavidin (SA)-coated Donor beads (80 µg/mL) の調製液 (2-2.事前準備の 4 項で調製) 25 µL を添加する。※最終 50 µL/well
5. 室温・遮光で 30 分間インキュベートする。
6. マイクロプレートリーダーNivo Alpha S を用いて AlphaScreen 設定により測定する。

### 3. 問い合わせ先

日機装株式会社

創薬研究用ヒト腎細胞お問い合わせアドレス

Mail: 3D-RPTEC@nikkiso.co.jp

HP: <https://www.nikkiso.co.jp/products/medical/3drptec/>

